مطالعه تنوع ژنتیکی پاتوتیپ‌های *Puccinia triticina* عامل زنگ قهوه‌ای گندم ایران بر اساس توالی یابی ناحیه rDNA IGS1 *

STUDY OF GENETIC DIVERSITY OF *Puccinia triticina* PATHOTYPES, THE CAUSAL AGENT OF WHEAT LEAF RUST IN IRAN BASED ON RDNA IGS1 SEQUENCING

علیرضا نیازمند [۱**]، مهرداد عباسی [۲]، فرزاد افشاری [۳]، سعید رضائی [۴] و شهاب حاج منصور [۴]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۴/۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۵)

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایرانی قارچ *Puccinia triticina*، یازده جدایه متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف تعیین فنوتیپی و پاتوتیپی گردیدند و ناحیه rDNA IGS1 توالی‌یابی شد. در رابطه با کلیه جدایه‌ها یک محصول PCR با اندازه ۸۷۰ جفت بازی به دست آمد. هم‌ردیف‌سازی توالی‌های IGS1 مربوط به جدایه‌های مورد بررسی نمایانگر ۱/۲-۰ درصد تفاوت بین آنها بود که بیانگر توالی‌های بسیار مشابه در این ناحیه است. با ترسیم درخت فیلوژنتیک بدون ریشه، به روش پیوست همسایه‌ها، جدایه‌های مورد بررسی در شش گروه متمایز قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ارتباط مستقیمی بین پاتوتیپ‌های شناسایی شده و گروه‌بندی حاصل از توالی‌یابی ناحیه IGS1 وجود ندارد.

واژه‌های کلیدی: فنوتیپ، توالی‌یابی، هم‌ردیف سازی، ماتریس نقطه‌ای، درخت فیلوژنتیک، پیوست همسایه‌ها

---

*: بخشی از پایان‌نامه دکتری نگارنده اول، ارایه شده به بخش بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: niazmand2003@yahoo.com

۱. استادیار بیماری شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم

۲. دانشیار بیماری شناسی گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

۳. دانشیار پژوهشی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج

۴. به ترتیب استادیار و کارشناس آزمایشگاه بخش بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

مقدمه

عوامل ایجاد کننده بیماری‌های زنگ، انگل‌های اجباری هستند که دارای میزبانان اختصاصی می‌باشند. قارچ *Puccinia triticina* Erikson که اخیرا نام علمی *Puccinia persistens* subsp. *triticina* (Erikson) Z. Urban & J. Markova برای آن مشخص گردیده (Abbasi *et al.* 2005)، عامل بیماری زنگ قهوه‌ای (زنگ برگی) گندم (*Triticum aestivum* L.) است که علاوه بر گندم دارای میزبانان متناوبی از گونه های *Anchus* spp.، *Clematis* spp.، *Thalictrum spp.* و *Isopyrum* spp. می‌باشد.

این بیماری به عنوان یک عامل کاهش‌دهنده محصول گندم در بسیاری از نقاط جغرافیایی جهان شناخته شده است (Kolmer, 2005; Marasas *et al*. 2004; Roelfs *et al.* 1992; Saari & Prescott, 1985). میزان کاهش محصول ناشی از این بیماری متفاوت بوده، از مقادیر بسیار کم تا بالای ۵۰% گزارش گردیده که این امر به زمان آلودگی، مرحله رشد و میزان مقاومت ارقام گندم وابسته می‌باشد (Chester 1946). در سال ۲۰۰۷ در ایالت کانزاس کاهش محصول گندم به میزان ۱۴% گزارش گردید (Appel *et al.* 2007). در کشور مصر کاهش محصول گندم ناشی از این بیماری به میزان بالای ۵۰% گزارش گردیده است (Abdel Hak *et al.* 1980). در ایران این بیماری یک بیماری اندمیک گندم است که هر ساله در مناطقی از شمال، جنوب و غرب ظهور یافته و باعث ایجاد خسارت می‌گردد (Afshari 2008).

در بسیاری از نقاط جهان، تحقیقات زیادی در رابطه با بررسی تفاوت‌های فنوتیپی و پاتوتیپی مابین جمعیت‌های مختلف این قارچ، صورت پذیرفته است. در بسیاری از این تحقیقات مبنای بررسی این تفاوت‌ها مایه‌زنی مصنوعی جدایه‌های این قارچ روی ارقام استانداردی است که دارای ژن‌های مقاومت (*Lr* genes) به این بیماری می‌باشند. بررسی واکنش‌های متقابل این ارقام با قارچ عامل بیماری تعیین کننده فاکتورهای پرآزاری موجود در قارچ عامل بیماری می‌باشد و بر این اساس پاتوتیپ قارچ بر اساس فرمول پرآزای/ ناپرآزاری روی ژن‌های مقاومت تعیین می‌شود.

در سال ۱۹۸۶ توسط کمیته زنگ قهوه‌ای آمریکای شمالی (North American Leaf rust Workers Committee) استفاده از ارقام تک ژنی با ژن‌های *Lr1*، *Lr2a*، *Lr2c*، *Lr3*، *Lr3ka*، *Lr9*، *Lr11*، *Lr16*، *Lr17*، *Lr24*، *Lr26* و *Lr30* برای تعیین نژاد و فاکتورهای پرآزاری و فنوتیپ زنگ قهوه‌ای پیشنهاد شد و تعیین نژادهای فیزیولوژیک در یک سیستم نام‌گذاری (Modified-Unified-Numeration) بر اساس فرمول پرآزای/ ناپرآزاری (Avirulence/Virulence) تصویب شد، هم‌چنین جهت تعیین فنوتیپ‌های جدایه‌ها از روش پیشنهادی توسط لانگ و کولمر (Long & Kolmer 1989) استفاده گردید.

در بسیاری از نقاط جهان و ایران تعیین پاتوتیپ‌های عامل بیماری زنگ قهوه‌ای گندم در حال انجام است و نتایج نشان می‌دهد که جمعیت‌های متفاوتی از پاتوتیپ‌های این قارچ در کشورهای مختلف در حال فعالیت و ایجاد بیماری روی گیاه گندم می‌باشند (Afshari *et al*. 2005, Bamdadian 1979, Hanzalova *et al.* 1993, Kazem *et al*. 2006, Long *et al.* 2002, McDonald & Martinez 1990, Niazmand *et al.* 2010). این امر بیانگر این نکته است که جمعیت‌های مختلف این قارچ از لحاظ ژنتیکی متنوع می‌باشند. فهم دقیق و عمیق از ساختار ژنتیکی جمعیت پاتوژن تأثیرات عمیقی بر کارایی روش‌های کنترل دارد. هر چند تحقیقات زیادی در خصوص بیماری زنگ گندم در بسیاری از نقاط جهان در حال انجام است، ولی

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

شناسایی کامل ساختار ژنتیکی جمعیت‌های این پاتوژن در مناطق جغرافیایی بزرگ (کشور و قاره) و کوچک (مزرعه، گیاه و حتی یک جوش) و تحت شرایط آب و هوایی مختلف ضروری است (Torabi *et al.* 2001).

در سال‌های اخیر به‌کارگیری نشانگرهای مولکولی جهت بررسی تفاوت‌های موجود میان قارچ‌های پارازیت گیاهی به طور وسیعی گسترش یافته است. موضوع بسیاری از این تحقیقات بررسی ژن‌های ریبوزومی (Ribosomal genes) بوده است (Henson & French 1993, Egger 1995, Ennos & McConnell, 1995, Bridge & Arora 1998, Grube & Korken 2000). در اغلب یوکاریوت‌ها، DNA ریبوزومی (rDNA) دارای واحدهای تکرار شونده از ژن‌هایی ۱۸s، ۵/۸s ، ۲۸s و 5s است که آر ان اهای ریبوزومی را کد می‌نمایند. این نقاط ژنومی توسط نواحی بین ژنی (Spacers)، به نام ITS (Internal Transcribed Spacer) و IGS (Intergenic Spacer) از هم جدا می‌شوند. IGS ناحیه‌ای غیر قابل رونویسی است و در بازیدیومیست‌ها و برخی اعضای دیگر شاخه‌های قارچی شامل دو ناحیه کوچک‌تر به نام‌های IGS1 و IGS2 می‌باشد. IGS1 ناحیه‌ای است ما بین ژن‌های 5s و ۲۸s و IGS2 بین ژن‌های 5s و ۱۸sقرار می‌گیرد (Reeder 1990). بخش IGS سریع‌ترین منطقه در حال تکامل rDNA است، که دارای تعدادی از توالی‌های تکرار شونده داخلی است که مختص گونه بوده و اغلب بین جمعیت‌ها، افراد و حتی در داخل یک سلول منفرد نیز دارای تنوع است (Paule & Lofquist 1996). ناحیه IGS، نسبت به ناحیه ITS دارای درجه بالاتری از تنوع درون و بین گونه‌ای بوده و به صورت کاملاً اختصاصی است. تنوع در ناحیه IGS و 5 s بین پاتوتیپ‌های قارچ عامل بیماری زنگ سیاه گندم گزارش گردیده است (Kim *et al.* 1992).

تعیین توالی‌های نواحی ITS1، ۵/۸s و ITS2 جدایه‌های جمع‌آوری شده قارچ *P. graminis* از نقاط مختلف ایران، اروپا و آمریکا و از میزبانان مختلف، نشان داد که علاوه بر وجود چند شکلی طولی بین جدایه‌ها در این نواحی، تفاوت‌هایی از لحاظ محتوای نوکلئوتیدی توالی‌ها نیز وجود دارد (Abbasi *et al.* 2005b). توالی‌های IGS1 سه جدایه اروپایی قارچ عامل بیماری زنگ زرد گندم که از لحاظ پاتوتیپ، منشأ جغرافیایی و پرآزاری تفاوت داشتند، مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی‌ها نشان داد که چند شکلی کمی بین سه جدایه در این ناحیه وجود دارد (Celine *et al.* 2002) چند شکلی در ناحیه IGS شش پاتوتیپ قارچ *P. hordei* عامل بیماری زنگ قهوه‌ای جو گزارش گردیده است (Jenning 1997).

بر اساس اطلاعات موجود تاکنون تحقیقی در رابطه با بررسی تفاوت‌های ژنتیکی بین پاتوتیپ‌های قارچ *P. triticina*، در ناحیه IGS1 انتشار نیافته است. با توجه به این امر که قارچ عامل بیماری زنگ قهوه‌ای گندم دارای تولید مثل جنسی است و از لحاظ پاتوتیپی و فنوتیپی تفاوت‌های زیادی در بین جمعیت‌های مختلف این قارچ گزارش گردیده است لذا هدف از انجام این تحقیق بررسی امکان وجود چند شکلی و تفاوت‌های ژنتیکی در بین پاتوتیپ‌ها و فنوتیپ‌های مختلف قارچ عامل زنگ قهوه‌ای گندم از نواحی مختلف آب و هوایی ایران بر اساس توالی‌یابی ناحیه IGS1 است.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه‌ها و تعیین فنوتیپ‌ها و پاتوتیپ‌های قارچ

دربهار سال ۱۳۸۷ تعداد ۱۱ نمونه برگی آلوده به زنگ قهوه‌ای گندم بر اساس مناطق پراکندگی و شرایط آب و

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

هوایی از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری گردیدند. این مناطق شامل اردبیل، اهواز، بروجرد، زرقان، ساری (سه جدایه)، کلاردشت، کرج، مشهد و همدان بودند. جهت تکثیر و خالص سازی، نمونه‌های برگی گندم آلوده به زنگ قهوه‌ای هر یک از جدایه‌ها به طور مجزا و به ابعاد مناسب بریده شده، سپس به مدت ۲۴ ساعت داخل تشتک‌های محتوی کاغذ صافی واتمن و آب مقطر سترون و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد داخل یخچال قرار داده شدند. یوردینیوسپورهای مرطوب توسط گوش پاک کن و یا قلم مو از روی نمونه‌های برگی جمع‌آوری گردیده و روی برگ‌های اول گیاهچه‌های ۱۴ روزه رقم حساس بولانی مایه‌زنی شدند. سایر مراحل تکثیر بر اساس روش *نیازمند و همکاران* (۲۰۱۰) انجام گردید. از ۳۹ لاین تک ژن ویک لاین دارای ژن‌های مقاومت *Lr10*، *Lr27+* و *Lr31* جهت تعیین پاتوتیپ‌های جدایه‌های جمع‌آوری شده استفاده گردید (جدول ۱). گیاهچه‌های مایه‌زنی شده ارقام استاندارد به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط تاریکی و دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۱۰۰% قرار گرفتند. سپس گیاهچه‌ها به گلخانه‌های با دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. پس از گذشت ۱۴-۱۲ روز از مایه‌زنی، یادداشت برداری تیپ آلودگی به روش *ماکینتاش و همکاران* (McIntosh *et al*. 1995) در مقیاس ۴-۰ صورت گرفت. تیپ‌های آلودگی ۰ تا ۲ به عنوان مقاوم یا غیر بیماری‌زا و تیپ‌های آلودگی ۳ و ۴ به عنوان حساس یا بیماری‌زا در نظر گرفته شدند. تعیین پاتوتیپ ها و فنوتیپ‌های جدایه‌ها بر اساس سیستم نام-گذاری *لانگ و کولمر* (Long & Kolmer 1989) صورت پذیرفت.

استخراج و تکثیر دی ان ا

جهت استخراج دی ان ا از روش *ریدر و برودا* (Reader & Broda 1985) با اندکی تغییر جهت ساییدن یوریدینیوسپورها استفاده شد. به این ترتیب که مقدار ۰/۲ گرم پودر یوریدینیوسپور از هر جدایه به طور مجزا در تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتر سترون ریخته شد و سپس به میزان ۰/۱ گرم پودر کاربراندوم اتو کلاو شده به تیوب‌ها افزوده گردید و توسط ازت مایع منجمد شد. جهت ساییدن یوریدینیوسپورهای منجمد از یک مته معمولی با دور موتور آهسته با یک نوک کوچک پلاستیکی (Mini-pestle) سترون به مدت ۳۰-۲۰ ثانیه استفاده گردید. بقیه مراحل استخراج بر اساس روش توصیه شده توسط *ریدر و برودا* (1985) انجام شد با این تفاوت که پس از اضافه کردن بافر استخراج به تیوب‌های محتوی اسپورهای ساییده شده، تیوب‌ها به مدت پنج دقیقه در دستگاه به هم زن با حد اکثر دور مخلوط گردیدند. جهت انجام PCR برای تکثیر ناحیه IGS1 از آغازگرهای (Giraud *et al.* 1997) dGCTACGATCCACTGAGGTTC L318 و (Wolters dCTTCGCAGATCGGACGGGAT 5sk & Erdmann 1988) استفاده گردید. این آغازگرها ناحیه بین ژنی موجود در بین ژن‌های s ۲۸ و s ۵ را در DNA ریبوزومی به نام IGS1 تکثیر می‌نمایند. مواد و مقادیر حجمی هر یک از آغازگرها و چرخه دمایی در PCR برای تکثیر ناحیه IGS1 بر اساس روش توصیه شده فوکس (Fox 1993) بود. پس از اتمام PCR محصولات آن روی ژل آگاروز یک درصد بررسی شدند. سپس این محصولات به شرکت ماکروژن کشورکره ارسال شد و توالی یابی تحت شرایط terminator cycling BigDye™ و توسط دستگاه توالی یاب مدل 3730XL انجام گرفت.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول ۱. ژن‌های مقاومت و لاین‌های افتراقی گندم مورد استفاده جهت تعیین پاتوتیپ‌های زنگ قهوه‌ای جدا شده از مناطق مختلف ایران

Table1. *Lr* genes and standard differential genotypes of wheat used for pathotypes identification of brown rust from different regions of Iran.

شماره	نام لاین‌های افتراقی	ژن‌های مقاومت
No.	Differential genotypes	*Lr* genes
1	Thatcher	***Lr22b*
2	TC*6/CENTENARIO (RL6003)	*Lr1*
3	TC*6/WEBSTER (RL6016)	*Lr2a*
4	TC*6/CARINA(RL6019)	*Lr2b*
5	TC*6/LOROS(RL6047)	*Lr2c*
6	TC*6/DEMOCRAT(RL6002)	*Lr3*
7	TC*6/ANIVERSARIO(RL6007)	*Lr3ka*
8	BAGE/8*TC(RL6042)	*Lr3bg*
9	TRANSFER/6*TC(RL6010)	*Lr9*
10	TC*6/EXCHANGE(RL6004)	*Lr10*
11	HUSSAR(W976)	*Lr11*
12	EXCHANGE/6*TC(RL6011)	*Lr12*
13	MANITUOU	*Lr13*
14	SELKIRK/6*TC(RL6013)	*Lr14a*
15	TC*6/MARIA ESCOBAR(RL6006)	*Lr14b*
16	TC*6/KENYA1483(RL6052)	*Lr15*
17	TC*6/EXCHANGE(RL6005)	*Lr16*
18	KLEIN LUCERO/6*TC(RL6008)	*Lr17*
19	TC*7/AFRICA43(RL6009)	*Lr18*
20	TC*7/TR(RL6040)	*Lr19*
21	THEW(W203)	*Lr20*
22	TC*6/RL5406(RL6043)	*Lr21*
23	TC*6/RL5404(RL6044)	***Lr22a*
24	LEE310/6*TC(RL6012)	*Lr23*
25	TC*6/AGENT(RL6064)	*Lr24*
26	TC*?/TRANSEC	*Lr25*
27	TC*6/ST-1-25(RL6078)	*Lr26*
28	GATCHER(W3201)	**Lr10, Lr27+,Lr31*
29	CS2D-2M	*Lr28*
30	TC*6/CS7AG#11(RL6080)	*Lr29*
31	TC*6/TERENZ10(RL6049)	*Lr30*
32	TCLR32(RL5497)	*Lr32*
33	TC*6/PI58548(RL6057)	*Lr33*
34	TC*6/PI58548(RL6058)	*Lr34*
35	RL5711	*Lr35*
36	E84018 (NEP/AE.SPELTOIDES.2-9-w…	*Lr36*
37	TC*6/VPM(RL6081)	*Lr37*
38	TC*6//CARINA(RL6051)	*Lrb*
39	GAZA(W277)(DURUM)	**Lr23+*
40	Altar 84 (Drum)	**Lr10+*

Seeds from Dr. R. Singh, CIMMYT Mexico- Karaj 1385

* : لاین محتوی چندین ژن مقاومت ** : + لاین دارای ژن‌های اضافه*** : ژن‌های مقاومت در مرحله گیاه کامل

*: Wheat line with multiple resistant gene **: + Wheat line with additive resistant gene ***: Adult plant resistant gene

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج حاصل از پرآزاری و ناپرآزاری جدایه‌های مورد بررسی روی ژن‌های مقاومت ارقام استاندارد با روش UPGMA و با بکارگیری نرم‌افزار NTSYS-pc نسخه (2.02e) تجزیه کلاستر شدند. بر همین اساس دندروگرام مربوط به تشابه جدایه‌ها ترسیم گردید. جهت ترسیم این دندروگرام یک ماتریس از پرآزاری و عدم پرآزاری هر جدایه برای هر ژن مقاومت (*Lr*) روی لاین‌های استاندارد (عدد ۰ برای عدم پرآزاری و عدد ۱ برای پرآزاری) در نظر گرفته شد و سپس با به کارگیری ضریب جاکارد دندروگرام مربوطه ترسیم گردید. با ترسیم خط برش در سطح ۰/۸۴ میزان تشابه جدایه‌ها تعیین گردید. جدایه‌هایی که در یک کلاستر قرار گرفتند دارای تشابه زیادی بودند و نسبت به سایر جدایه‌هایی که در کلاسترهای دیگر قرار می‌گرفتند متفاوت بودند.

برای تأیید هویت توالی‌های تکثیر شده IGS1، این توالی‌ها به کمک موتور جستجوی NCBI Blast Search مورد بررسی قرار گرفتند. هم‌چنین توالی‌های تهیه شده، از طریق سایت Bankit به بانک ژن ارائه گردیدند و شماره دسترسی آن اخذ شد (جدول ۲). بعد از آماده‌سازی توالی‌ها، هم‌ردیف‌سازی چند گانه توالی‌ها با کمک نرم افزار MEGA4 انجام گرفت. به منظور بررسی چگونگی ارتباط توالی ناحیه IGS1 جدایه‌های ایرانی با یک دیگر و با تعدادی از توالی به دست آمده ازقسمتTrace archives بانک ژن (NCBI GenBank) با شماره‌های دسترسی TI۲۲۲۶۶۶۴۷۱، TI۲۲۲۶۶۶۶۴۲۶ ، TI۲۲۲۶۶۴۳۴۲۲ و TI۲۲۲۶۶۷۲۹۴۷، درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار MEGA4 و به روش پیوست همسایه‌ها (Neighbor joining) ترسیم گردید.

نتایج

تعیین پاتوتیپ و فنوتیپ جدایه‌ها

نتایج مربوط به تعیین پاتوتیپ و فنوتیپ جدایه‌های *P. triticina* در جدول ۳ آورده شده است. همان‌طوری که در این جدول دیده می‌گردد به جز جدایه‌های اهواز و کرج که از لحاظ فنوتیپی و پاتوتیپی کاملاً مشابه یکدیگر می‌باشند سایر جدایه‌های مورد بررسی از لحاظ فنوتیپی و پاتوتیپ تعیین شده متفاوت بودند.

تنوع و تشابه جدایه‌ها بر اساس آنالیز کلاستر

نتایج مربوط به تنوع و تشابه پاتوتیپ‌ها بر اساس تجزیه کلاستر در شکل (۱) آورده شده است. این گروه‌بندی‌ها بیانگر میزان تشابه (بیش از ۸۴%) جدایه‌ها از لحاظ فاکتورهای پرآزاری و نا پرآزاری روی ژن‌های مقاومت می‌باشد. جدایه‌هایی که در یک کلاستر قرار گرفتند از لحاظ پاتوتایپی دارای تشابه بیش از ۸۴% هستند. بر اساس دندروگرام ترسیم شده و با در نظر گرفتن خط برش در سطح ۸۴٪، جدایه‌های مورد بررسی در ۶ گروه متمایز قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل توالی‌های جدایه‌ها

تکثیر ناحیه IGS1 دی ان ای ریبوزومی، یازده پاتوتیپ زنگ قهوه‌ای گندم با به کارگیری جفت آغازگر های L318 و 5SK تولید یک باند ۸۷۰ جفت بازی نمود (شکل ۲). وجود این باندهای یکسان در رابطه با کلیه جدایه‌ها بیانگر عدم وجود پلی‌مورفیسم طولی جدایه‌های مورد بررسی در این ناحیه از دی ان ای می‌باشد. پس از تعیین توالی این قطعات با کمک نرم افزار NCBI Blast Search مشخص گردید که توالی‌های تکثیر شده جدایه‌ها با

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول ۲. رس شمار توالی‌های IGS1 جدایه‌های ایرانی *Puccinia triticina* در بانک ژن.

Table 2. GenBank accession numbers of IGS1 sequences of Iranian isolates of *Puccinia triticina*.

شماره No	نام جدایه‌ها Isolate names	رس شمار Accession No.
1	Ardabil	HM590475
2	Ahvaz	HM590476
3	Brojerd	HM590477
4	Zarghan	HM590485
5	Sari1	HM590482
6	Sari2	HM590483
7	Sari3	HM590484
8	Kelardasht	HM590480
9	Karaj	HM590479
10	Mashhad	HM590481
11	Hamedan	HM590478

قسمت‌هایی از نواحی 28S و قسمت‌های انتهایی مربوط به ناحیه IGS1 دی ان ای ریبوزومی *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* دارای تشابه بودند. با توجه به عدم وجود اطلاعات مربوط به توالی این ناحیه از دی ان ای قارچ *P. triticina* در بانک ژن و با توجه به پایین بودن میزان تشابه این ناحیه تکثیر شده با ناحیه IGS1 از *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* تکثیر ناحیه IGS1 *P. triticina* مورد تأیید قرار گرفت.

هم ردیف سازی ۷۱۰ جفت بازی از توالی‌های IGS1 مربوط به جدایه‌های مورد بررسی نشان دهنده ۱/۲-۰ درصد تفاوت بین آنها بود. هم‌چنین هنگامی که جدایه‌های جمع‌آوری شده مورد مقایسه قرار گرفتند چهار ناحیه جهش یافته و هنگامی که با جدایه‌های دریافتی از بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفتند ۲۲ ناحیه جهش یافته در طول توالی‌های مورد بررسی مشاهده گردید (شکل ۳). این مقدار تفاوت مابین توالی‌های ناحیه IGS1 معنی دار نبوده و نشان‌دهنده تفاوت‌های بسیار اندک در این ناحیه از جدایه‌های مورد بررسی است.در مورد جدایه‌ساری۳، یک ناحیه حذف شده متشکل از ۲۹ باز که در محدوده بازهای شماره ۹۵-۶۴ قرار می گیرد مشاهده گردید که نسبت به سایر جدایه‌های مورد بررسی دارای تفاوت معنی‌داری بود.

ارتباطات فیلوژنتیکی جدایه‌ها در ناحیه rDNA IGS1

درخت فیلوژنتیک بدون ریشه، براساس توالی‌یابی محصولات حاصل از ناحیه IGS1 جدایه‌های جمع‌آوری شده از ایران با جدایه‌های دریافت شده از بانک ژن، ترسیم شد. بر اساس درخت فیلوژنتیک، جدایه‌ها در شش تبار (Clade) قرار گرفتند (شکل ۴).

گروه اول شامل جدایه‌های ایرانی اهواز، کلاردشت، زرقان، بروجرد و کرج به همراه دو جدایه با شماره‌های شناسایی TI۲۲۲۶۶۷۲۹۷۴ و TI۲۲۲۶۶۴۳۴۲۲ در بانک ژن

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول ۳. فنوتیپ‌های پرآزاری و فرمول پرآزاری/ غیر پرآزاری جدایه‌های زنگ قهوه‌ای *Puccinia triticina* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران در سال ۱۳۸۷.

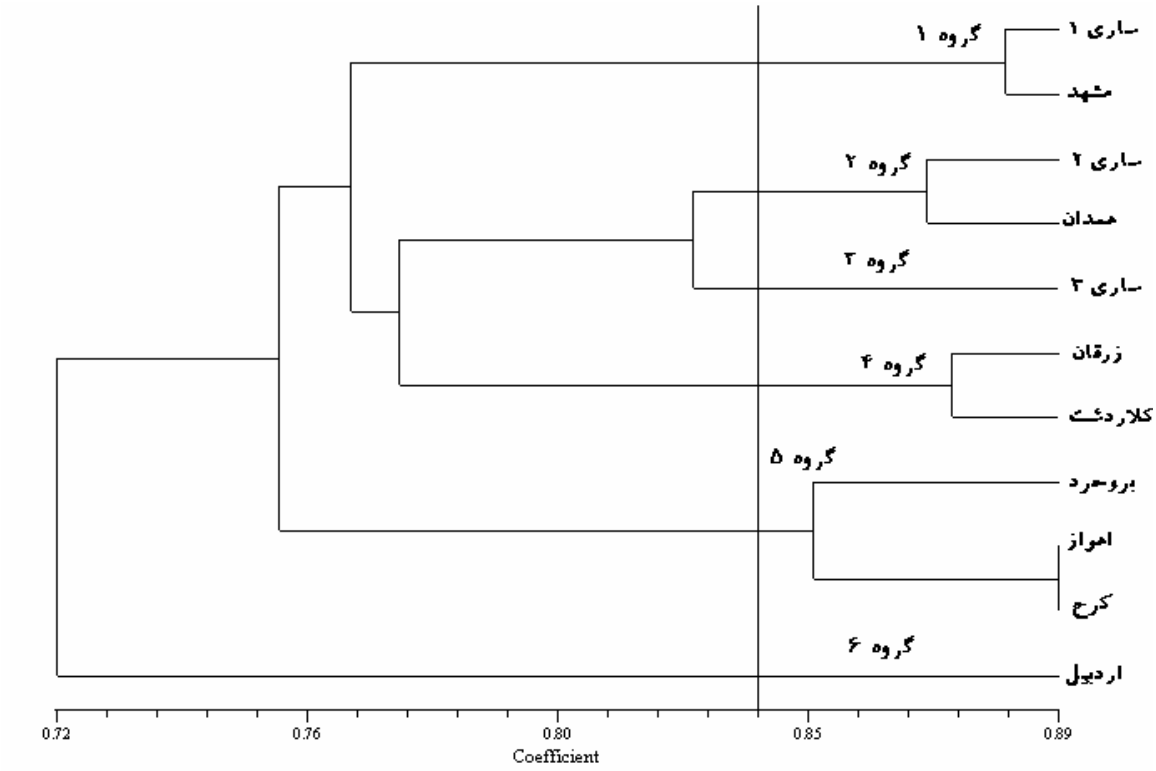
Table 3. Phenotypes and Avirulence/virulence formula of brown rust *Puccinia triticina* isolates collected from different regions of Iran in 2007.

شماره No.	فنوتیپ‌های پرآزاری Virulence Phenotypes	فرمول پرآزاری / نا پرآزاری (ژن‌های *Lr*) Avirulence/virulence formula (*Lr* genes)	مناطق Regions
1	FHRR	10+27+31,1,2a,2b,9,10+,15,17,19,21,23,23+,24,25,28,34,36/b,2c,3,3bg,3ka, 10,11,12,13,14a,14b,16,18,20,22a,22b,26,29,30,32,33,35,37	Sari1
2	PKTT	10+27+31,2a,9,10+,19,20,25,28,29,33,36,23+/b,1,2b,2c,3,3bg,3ka,10,11,12, 13,14a,14b,15,16,17,18,22b,21,22a,23,24,26,30,32,34,35,37	Sari2
3	MKRT	10+27+31,2a,2b,2c,9,10+,15,17,19,23,23+,25,28,29,32,36/b,1,3,3bg,3ka,10, 11,12,13,14a,14b,16,18,20,21,22a,22b,24,26,30,33,34,35,37	Sari3
4	PHRT	10+27+31,2a,2b,9,10+,15,17,19,23+,24,25,28,29,32,34,36/b,1,2c,3,3bg,3ka, 10,11,12,13,14a,14b,16,18,20,21,22a,22b,23,26,30,33,35,37	Mashhad
5	MKTT	2a,2b,2c,9,10+,19,23+,25,28,29,34,36/b,1,3,3bg,3ka,10,11,12,13,14a,14b,15 ,16,17,18,20,21,22a,22b,23,24,26,10+27+31,30,32,33,35,37	Borojerd
6	PFTS	10+27+31,2a,9,10+,15,16,18,19,23,23+,25,28,29,33,34,36/b,1,2b,2c,3,3bg,3 ka,10,11,12,13,14a,14b,17,20,21,22a,22b,24,26,30,32,35,37	Ardabil
7	PHKT	10+27+31,2a,2b,3ka,9,10+,19,21,23+,24,25,28,29,34,36/b,1,2c,3,3bg,10,11, 12,13,14a,14b,15,16,17,18,20,22a,22b,23,26,30,32,33,35,37	Ahvaz
8	PGTT	10+27+31,2a,9,10+,19,23,23+,25,26,28,29,36/b,1,2b,2c,3,3bg,3ka,10,11,12, 13,14a,14b,15,16,17,18,20,21,22a,22b,24,30,32,33,34,35,37	Kelardasht
9	CKTT	10+27+31,1,2a,2b,2c,9,19,21,23,23+,25,28,34/b,3,3bg,3ka,10,10+,11,12,13, 14a,14b,15,16,17,18,20,22a,22b,24,26,29,30,32,33,35,36,37	Zarghan
10	PHKT	10+27+31,2a,2b,3ka,9,10+,19,21,23+,24,25,28,29,34,36/b,1,2c,3,3bg,10,11, 12,13,14a,14b,15,16,17,18,20,22a,22b,23,26,30,32,33,35,37	Karaj
11	PJTT	10+27+31,2a,9,10+,19,23,23+,25,26,28,29,36/b,1,2b,2c,3,3bg,3ka,10,11,12, 13,14a,14b,15,16,17,18,20,21,22a,22b,24,30,32,33,34,35,37	Hamedan

(NCBI Blast Search Trace Identification)، بودند. جدایه‌های ساری۱، ساری۲، همدان و اردبیل در گروه دوم قرار گرفتند. جدایه مشهد یک گروه مجزا را تشکیل داده بود (گروه ۳). جدایه ساری۳ در گروه چهارم، جدایه دریافتی با شماره شناسایی TI۲۲۲۶۶۶۶۴۲۶ در گروه پنجم و جدایه دریافتی با شماره شناسایی در بانک ژن، در گروه TI۲۲۲۶۶۶۶۴۷۱ پنجم قرار گرفتند. از بین شش گروه تشکیل شده گروه‌های اول تا سوم از تأیید بالایی بر اساس آزمون بوت استراپ برخوردار نبودند (۳۳% و ۵۸%) و لذا می‌توان این دو گروه را یک گروه در نظر گرفت. بقیه گروه‌های تشکیل شده از مقدار بوت استراپ قابل قبولی برخوردار بودند (۹۴%).

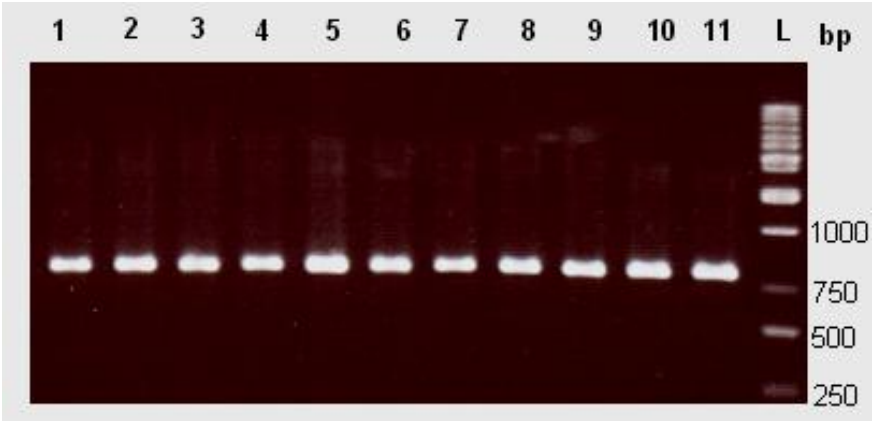
مقایسه درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با دندروگرام تشابه جدایه‌ها (شکل ۱ و ۵)، نشان داد که جدایه‌های بروجرد، اهواز و کرج در درخت فیلوژنتیکی و دندروگرام ترسیمی، در یک گروه قرار گرفتند. در درخت فیلوژنتیک

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



شکل ۱. دندروگرام تشابه جدایه‌های زنگ قهوه‌ای گندم *Puccinia triticina* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران در سال ۱۳۸۷ بر اساس ضریب جاکارد و پرآزاری و نا پرآزاری روی لاین‌های استاندارد.

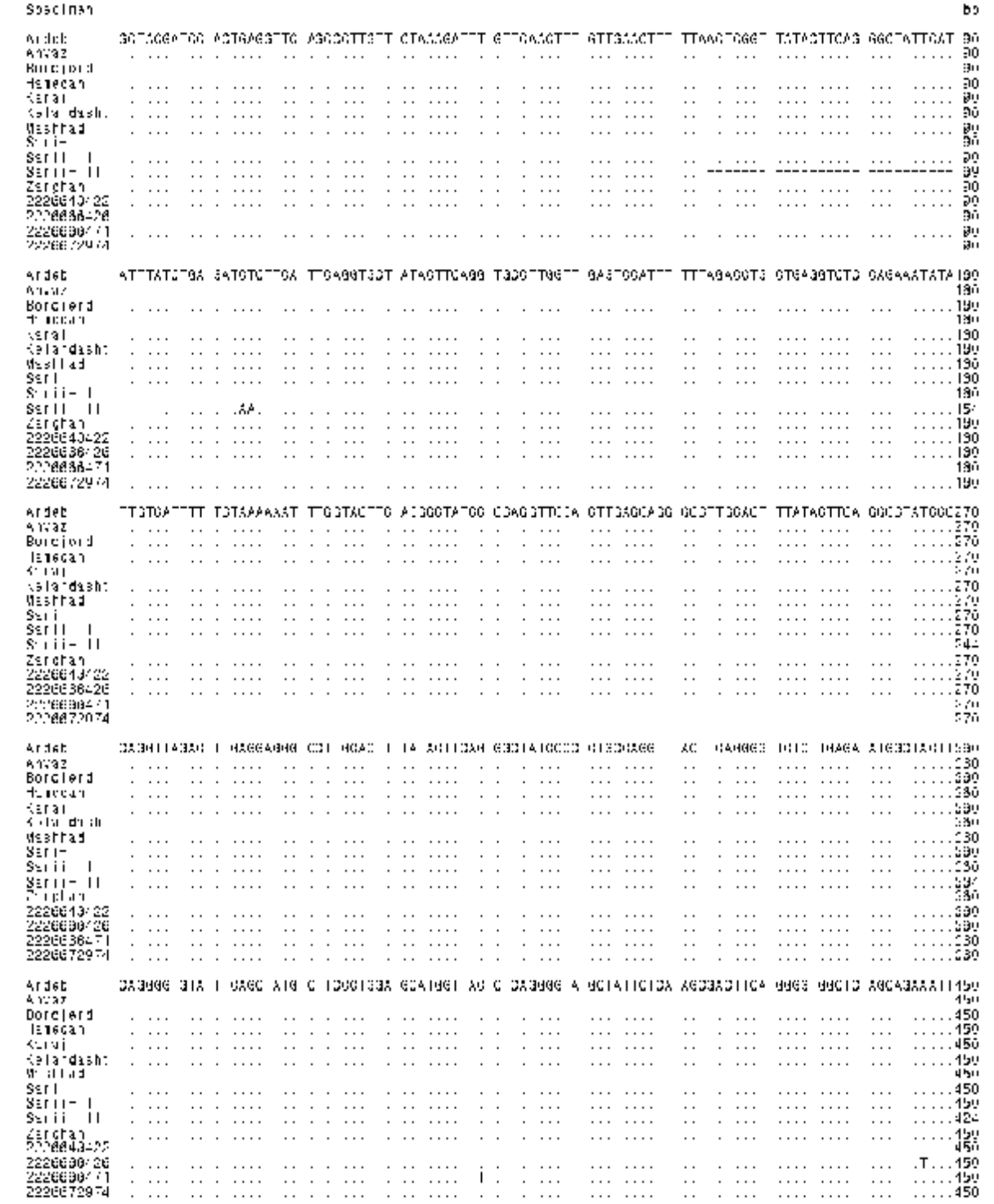
Fig. 1. Similarity dedrogram based on Jaccard coefficient of brown rust of wheat *Puccinia triticina* collected from different regions of Iran in 2007 based on virulence and avirulence on differential lines.



شکل ۲. محصولات PCR حاصل از تکثیر ناحیه IGS1 یازده جدایه *Puccinia triticina* جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران.

Fig. 2. PCR amplification products of the IGS1 of eleven isolates of *Puccinia triticina* from different regions of Iran.

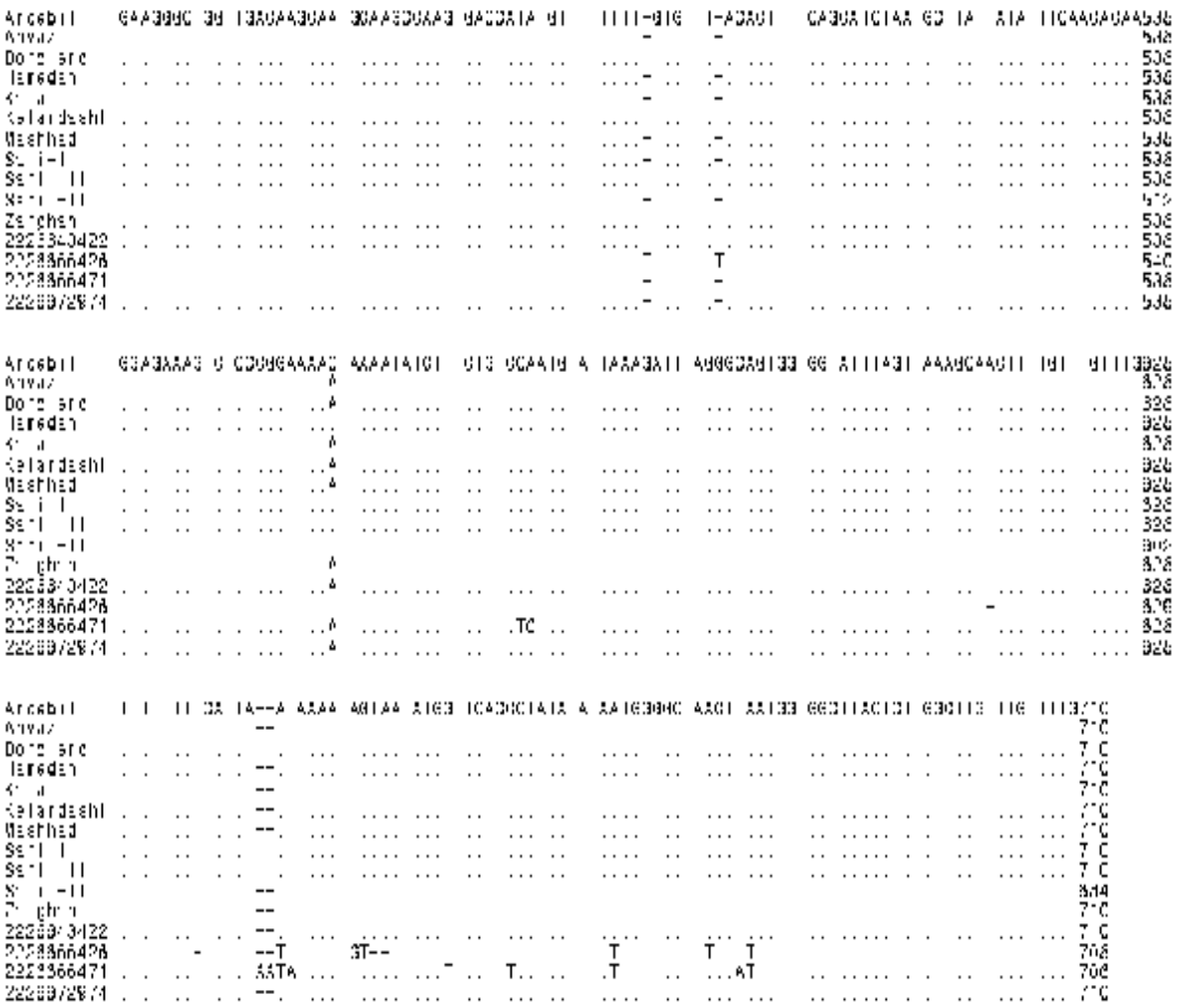
PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



شکل۳. هم ردیف‌سازی توالی‌های ناحیه IGS1 جدایه‌های جمع‌آوری شده زنگ قهوه‌ای گندم *Puccinia triticina* جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران.

Fig. 3. Alignment of the IGS1 nucleotide sequences for collected isolates of wheat brown rust *Puccinia triticina* from different regions of Iran.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

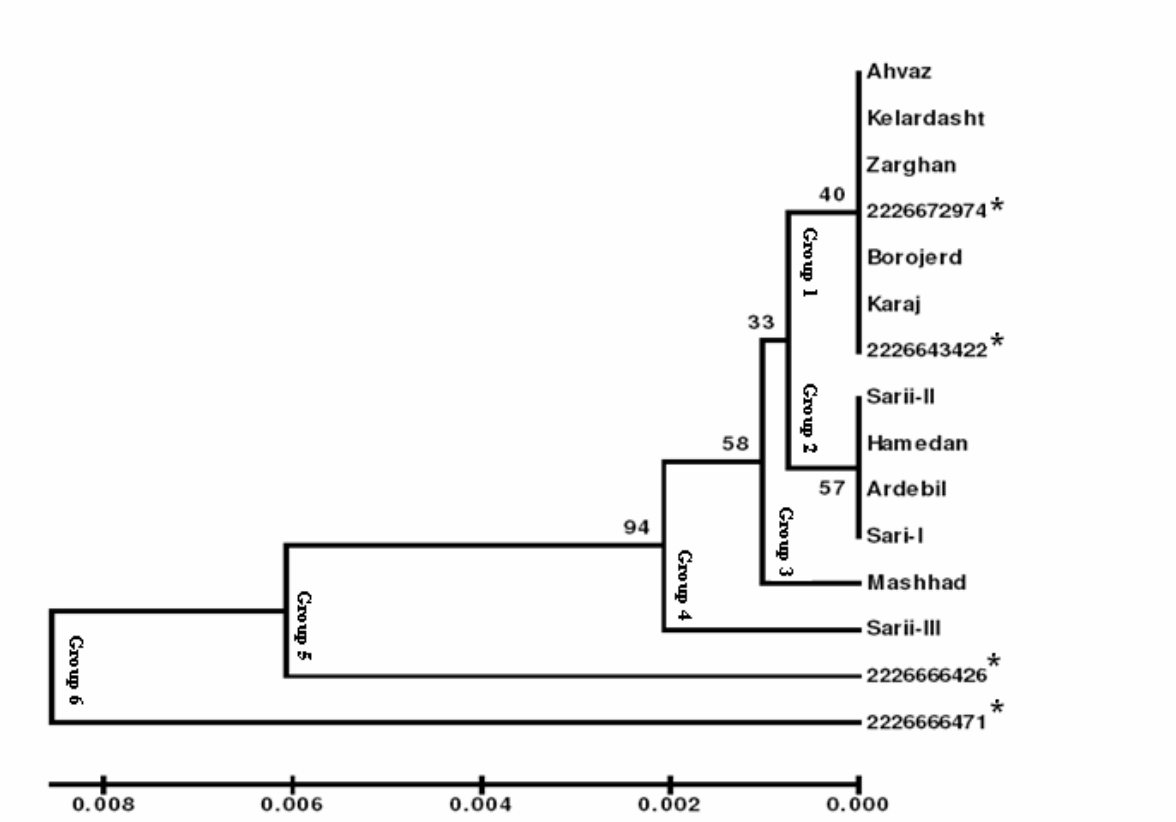


ادامه **شکل۳. هم ردیف‌سازی توالی‌های ناحیه IGS1 جدایه‌های جمع‌آوری شده زنگ قهوه‌ای گندم *Puccinia triticina* جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران.**

Fig. 3. Alignment of the IGS1 nucleotide sequences for collected isolates of wheat brown rust *Puccinia triticina* from different regions of Iran.

جدایه‌های ساری۳ و مشهد در دو گروه مجزا قرا گرفته بودند و در دندروگرام ترسیمی جدایه اردبیل در یک گروه مجزا قرار داشت. در درخت فیلوژنتیک جدایه مشهد تشکیل یک گروه مجزا را داد در صورتی که در دندروگرام ترسیم شده جدایه مشهد با جدایه ساری۱ در یک گروه قرار گرفتند. در درخت فیلوژنتیک جدایه های ساری۱ و ساری۲ در یک گروه قرار گرفتند در صورتی که در دندروگرام ترسیمی این دو جدایه در دو گروه متفاوت قرار داشتند. بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که ارتباط نزدیکی بین گروه‌بندی پاتوتیپ ها و توالی‌های ناحیه IGS1 جدایه‌های مورد بررسی وجود ندارد. هم‌چنین امکان برقراری ارتباط بین گروه‌های به دست آمده در درخت فیلوژنتیک و پراکنش جغرافیایی جدایه‌ها میسر نگردید.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



*: Accesion number of NCBI GenBank

* : شماره دسترسی در بانک ژن

شکل ۴. درخت فیلوژنتیک فاقد ریشه بر اساس توالی‌یابی IGS1 جدایه‌های زنگ قهوه‌ای گندم *Puccinia triticina* جمع‌آوری شده از ایران و جدایه‌های دریافت‌شده از بانک ژن.

Fig. 4. Unrooted neighbor joining phylogenetic tree based on IGS1 rDNA sequences of Iranian and foreign isolates of brown rust *Puccinia triticina* (asteric specimens retrived from GenBank)

بحث

علی‌رغم تفاوت در طیف پرآزاری و جدایی جغرافیایی جدایه‌های مورد بررسی، توالی‌های مربوط به ناحیه IGS1 جدایه‌های مورد بررسی دارای تفاوت‌های اندکی بودند. در رابطه با سه جدایه فرانسوی و سوئدی قارچ *Puccinia striiformis* f.sp *tritici* نیز نتایج به دست آمده از تکثیر ناحیه IGS1 منجر به تولید دو قطعه ۱/۳ و ۱/۱ کیلوبازی شد که میزان اختلافات درونی این توالی‌های تکثیر شده ۱/۱-۰/۷ درصد بود و چنین نتیجه‌گیری شد که تفاوت در توالی‌های این ناحیه در جدایه‌های مورد بررسی بسیار اندک می‌باشد (Ceilen *et al.* 2002). در مطالعه IGS1 مربوط به شش جدایه قارچ *Puccinia hordei* از چهار نژاد متفاوت فقط ۰/۱۷ – ۰/۵ درصد اختلاف در یک قطعه تولیدی ۰/۶ کیلوبازی حاصل از تکثیر این ناحیه مشاهده شد (Jennings *et al.* 1997). تحقیق حاضر نیز نشان داد که بین توالی‌های IGS1 جدایه‌های قارچ *P. triticina* نیز تفاوت اندکی وجود دارد.

از تکثیر ناحیه IGS1 در رابطه با کلیه جدایه‌های

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ایرانی زنگ قهوه‌ای گندم مورد بررسی فقط یک باند ۸۷۰ جفت بازی تولید شد که نشان‌دهنده عدم وجود چند شکلی طولی در توالی‌های مورد بررسی بود. هم‌چنین با توجه به این امر که یوریدینیوسپورهای عوامل ایجاد کننده زنگ غلات دی‌کاریوتیک هستند وجود تک باند حاصله بیانگر هموزیگوت بودن یوریدینیوسپورهای قارچ عامل بیماری زنگ قهوه‌ای گندم در ناحیه IGS1 می‌باشد. در رابطه با قارچ *P. striiformis* f.sp. *tritici* پلی‌مورفیسم طولی و هتروزیگوسیتی در این ناحیه گزارش گردیده است (Ceilen *et al*. 2002). در قارچ *Laccaria bicolor* که یک بازیدیومیست اکتومیکوریز می‌باشد هتروزیگوسیتی در ناحیه IGS1 گزارش شده است (Martin *et al*. 1999). تکثیر ناحیه IGS1، ۱۴ جدایه متعلق به نه نژاد متفاوت قارچ *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*، تولید ۶-۱ باند ۱/۵۸-۱/۰۲ کیلو بازی نمود که این امر بیانگر وجود پلی‌مورفیسم طولی ناحیه IGS1 در این قارچ است (Kim *et al*. 1992). پلی‌مورفیسم طولی در این ناحیه در رابطه با قارچ *Puccinia hordei* گزارش نشده است (Jennings *et al*. 1997).

در دنیا تحقیقات بسیار کمی در رابطه با توالی‌های ناحیه IGS1 قارچ‌ها و به خصوص در رابطه با جنس *Puccinia* انجام پذیرفته است. هرچند که تحقیق حاضر روی تعداد کمی از جدایه‌های قارچ *P. triticina* انجام پذیرفت اما نشان داد که در میان توالی‌های جدایه‌های مورد بررسی در این ناحیه تفاوت‌های اندکی وجود دارد. به دلیل فشار تکاملی اندک نواحی فاقد اطلاعات ژنتیکی در دی‌ان‌آ ریبوزومی از جمله نواحی IGS معمولا دارای تنوع بالایی هستند. در بررسی حاضر با این‌که جدایه‌های تعیین توالی شده زنگ قهوه‌ای از مناطق جغرافیایی مختلف کشور جمع‌آوری شده بودند، وجود تفاوت اندک در توالی ناحیه IGS1 این جدایه‌ها مؤید یک نواختی جمعیت‌های فعال زنگ قهوه‌ای در ایران و منشا گرفتن آنان از یک جمعیت نیایی وارد شده به کشور در گذشته نه چندان دور است. لزوم انجام تحقیقات بیشتری در رابطه با سایر نواحی دی ان ای ریبوزومی جهت یافتن نواحی که به عنوان یک نشانگر مولکولی جهت شناسایی پاتوتیپ های این قارچ مورد استفاده قرار گیرند ضروری به نظر می‌رسد. این تحقیق اولین گزارش در رابطه با بررسی توالی‌های این ناحیه از دی ان ای ریبوزومی قارچ عامل بیماری زنگ قهوه‌ای گندم در جهان می‌باشد.

بررسی تشابه پاتوتایپی جدایه‌ها با به کارگیری دندروگرام ترسیم شده و ارتباط میان توالی‌های ناحیه IGS1 این جدایه‌ها با پاتوتیپ آنها بیانگر عدم وجود یک ارتباط منطقی بین پاتوتیپ‌ها و توالی‌های ناحیه IGS1 بود. هر چند که در دندروگرام ترسیم شده جدایه‌های بروجرد، اهواز و کرج کاملاً مشابه بودند و در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده نیز این دو جدایه در یک گروه قرار گرفتند اما در رابطه با سایر جدایه‌های مورد بررسی چنین ارتباطی مشاهده نشد. بنابراین بررسی توالی‌های این ناحیه نمی‌تواند به عنوان یک نشانگر جهت تعیین تشابه‌ها و تفاوت‌های میان پاتوتیپ‌های این قارچ مورد استفاده قرار گیرد و باید تحقیقات بیشتری جهت یافتن نواحی دیگری از دی ان ای که بیانگر این نوع ارتباطات باشد، در آینده انجام پذیرد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (55-53) متن انگلیسی مراجعه شود.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com